

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE 1932

N° 3

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
de la Synthèse et de l'Hydrolyse Biochimique
de quelques alcool-d-xylosides β

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

Présentée et soutenue le Décembre 1932

PAR

JEAN LANGLOIS

PHARMACIEN

Interne des Hôpitaux de Paris

JURY { MM. BOUGAULT, *Président*,
HÉRISSEY, *Professeur*.
FLEURY, *Agrégé*.

Imprimerie C. SERRE

23, Rue de Rocroy

PARIS-X^e

TRUDAINE 81-09

1932

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE 1932

N° 3

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
de la Synthèse et de l'Hydrolyse Biochimique
de quelques alcool-d-xylosides β

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

Présentée et soutenue le Décembre 1932

PAR

JEAN LANGLOIS

PHARMACIEN

Interne des Hôpitaux de Paris

JURY { MM. BOUGAULT, *Président*,
 HÉRISSEY, *Professeur*.
 FLEURY, *Agrégé*.

Imprimerie C. SERRE

23, Rue de Rocroy

PARIS-X.

TRUDAINE 81-09

1932

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. P. GUÉRIN,	Doyen, *, § I.
P. LEBEAU,	Assesseur, O. *, § I.
P. DESPORT,	Secrétaire, *, § I.

PROFESSEURS

MM. GUÉRIN, *, § I.	Botanique générale.
BEHAL, Membre de l'Institut, G. O. *, § I.	Chimie organique.
PERROT, O. *, § I.	Histoire naturelle des Médica- ments.
COUTIÈRE, O. *, § I.	Zoologie.
LEBEAU, O. *, § I.	Pharmacie chimique.
BOUGAULT, *, § I.	Chimie analytique.
GORIS, *, § I.	Pharmacie galénique.
TASSILLY, *, § I.	Physique.
DAMIENS, *, § I.	Chimie minérale.
HÉRISSEY, O. *, § I.	Chimie biologique.
SOMMELET, *, § I.	Hydrologie et Hygiène.
LUTZ, *, § I.	Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, § I.	Toxicologie.
LAUNOY, O. *, § I.	Professeur sans chaire.

Doyen Honoraire : M. RADAIS, O. *, § I.

Professeurs Honoraires : MM. DELÉPINE, O. *, § I.
GUERBET, O. *, § I.

CHARGÉS DE COURS

MM. Marc HONORAT, *, § I.	Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LAUNOY, O. *, § I.	Pharmacodynamie.
DELABY, *, § I.	Minéralogie.
PICON *, § I.	Chimie minérale.
BACH, § I.	Microbiologie.

AGRÈGÉS EN EXERCICE

MM. DELABY, *, § I.	MM. MASCRÉ, § I.	MM. BEDEL, § I.
PICON, § I.	FLEURY, § I.	REGNIER, § I.
	BACH, § I.	

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEDEL, § I., agrégé chargé des T. P. de 1 ^{re} année	Chimie générale.
FLEURY, § I. et REGNIER, § I., agregés, chargés des travaux de ..	Chimie analytique.
SOUÈGES, § I.	Micrographie.
LEROUX, § I.	Physique.
DEVAL, § I.	Microbiologie.
DELABY, *, § I., PICON, § I. et MASCRÉ, § I., agrégés, chargés des	Travaux généraux de 4 ^e année.
<i>Bibliothécaire en Chef</i> : M. BERNARD, § I.	



A LA MÉMOIRE DE MON REGRETTÉ MAÎTRE

LE PROFESSEUR BRIDEL

Professeur au Muséum d'Histoire Naturelle

Pharmacien-Chef de l'Hôpital Lariboisière

Chevalier de la Légion d'Honneur

A MONSIEUR LE PROFESSEUR BOUGAULT

Professeur à la Faculté de Pharmacie
Pharmacien-Chef de l'Hôpital de la Charité
Chevalier de la Légion d'Honneur

Hommage de respect et de gratitude.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR HÉRISSEY

Professeur à la Faculté de Pharmacie
Pharmacien-Chef de l'Hôpital Saint-Antoine
Officier de la Légion d'Honneur

Hommage de respectueuse reconnaissance.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

Introduction

C'est en cherchant à réaliser la synthèse du salicoside à l'aide de la glucosidase β de l'émulsine des amandes qu'Em. Bourquelot et M. Bridel (5) découvrirent la méthode de synthèse biochimique des alcool-glucosides.

Cette méthode s'est montrée féconde. D'abord appliquée au glucose lui-même, elle permit de préparer facilement avec la plupart des alcools les hétérosides β correspondants. Puis, ayant mis en évidence la présence d'une lactase dans l'émulsine des amandes, Em. Bourquelot, H. Hérissé et M. Bridel (8) effectuèrent la synthèse biochimique des alcool-galactosides β . Enfin, M. Bridel et C. Béguin (10) ont montré la présence d'une petite quantité de l-arabinosidase α dans l'émulsine des amandes et ont effectué la synthèse biochimique de l'éthyl-l-arabinoside α .

M. Bridel a signalé (9) dans l'émulsine des amandes la présence d'une faible quantité de primevérase, hydrolysant lentement le primevérose en xylose et glucose. Or, l'étude du primevérose par A. Goris et Ch. Vischniac (18) et sa synthèse par la méthode des sucres acéto-halogénés (20) montrent que ce biose est un xyloside β du d-glucose. Existe-t-il dans l'émulsine des amandes une xylosidase β ? Peut-on utiliser ce ferment pour réaliser la synthèse et l'hydrolyse biochimique des alcool-xylosides β ? Tel est l'objet de nos recherches.

Ce travail est divisé comme suit :

- I. — Préparation des matières premières.
 - II. — Action synthétisante de l'émulsine des amandes sur le xylose en solution dans l'alcool éthylique. Synthèse, extraction et étude de l'éthylxyloside β .
 - III. — Préparation et propriétés du méthylxyloside β . Son hydrolyse par l'émulsine des amandes. Action de l'émulsine des amandes sur le xylose en solution dans l'alcool méthylique.
 - IV. — Action de l'émulsine des amandes sur le xylose en solution dans l'alcool propylique normal.
 - V. — Recherche de la xylosidase β dans divers produits fermentaires.
 - VI. — Conclusions.
-

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Physique Végétale du Muséum National d'Histoire Naturelle, sous la direction de notre regretté Maître, M. le Professeur Bridel.

Au cours de notre séjour dans son laboratoire, nous avons pu apprécier la haute valeur scientifique de ce Maître bienveillant qui savait, dans son enseignement quotidien, répandre autour de lui son goût ardent de la recherche. J'adresse aujourd'hui ici, un hommage de profonde reconnaissance à la mémoire de ce Savant distingué, cruellement ravi en pleine activité à l'affection des siens et de ses élèves.

Je tiens à assurer de toute ma gratitude M. le Professeur Bougault pour l'aimable accueil qu'il m'a réservé et pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

J'exprime ma vive reconnaissance à M. le Professeur Hérissé qui m'a fait si aimablement profiter de ses conseils judicieux, ainsi qu'à M. le Professeur agrégé Fleury qui a bien voulu accepter d'être membre de ce jury.

Je remercie également M. Berthou, pharmacien à Laon qui, au cours de mon stage officinal, fut mon premier et excellent Maître et sût m'intéresser à la Pharmacie.

Je n'aurai garde d'oublier mon camarade Rabaté, sous-directeur du Laboratoire de Physique Végétale, dont les conseils et les encouragements m'ont été d'un si précieux secours après la disparition de notre Maître commun.

PREMIERE PARTIE

Préparation des matières premières

I. — L'ÉMULSINE

Au cours d'essais préliminaires, nous avons pu nous assurer que l'émulsine des amandes agit sur les xylosides β . Mais son action est très lente. Nous avons donc été amenés à préparer des quantités relativement considérables de ce produit fermentaire.

Nous nous adressons, d'une part, aux amandes douces, d'autre part aux tourteaux d'amandes amères.

Les amandes douces sont traitées selon la méthode préconisée par G. de Saint-Stéban (28).

Les tourteaux d'amandes amères sont traités selon la méthode de percolation rapide préconisée par M. Bridel et Mlle Desmarets (12).

Dans les deux cas, le liquide provenant de la macération aqueuse est privé de caséine par coagulation au moyen de l'acide acétique, puis additionné d'alcool jusqu'à obtention d'un titre alcoolique de 60 c. Le précipité formé est recueilli par centrifugation à l'aide d'une supercentrifugeuse Sharples. L'émulsine se rassemble en un gâteau crémeux sur les parois du bol. Elle est desséchée dans le vide sulfurique et pulvérisée finement. Les produits de divers traitement sont mélangés et conservés en vase bien bouché.

Nous avons préparé ainsi :

a) A partir de 2 kg. d'amandes douces, 28 g. d'une émulsine très blanche.

b) Par de nombreux traitements des tourteaux d'amandes amères, 415 g. d'émulsine.

II. — LE XYLOSE

Le d-xylose ou sucre de bois isolé pour la première fois par Koch en 1886 a, depuis lors, fait l'objet de nombreux travaux, notamment de la part de M. G. Bertrand (1).

Inconnu à l'état libre dans la nature, il s'y trouve fréquemment sous forme d'hétérosides : primevérosides, et surtout d'holosides très condensés : xylanes.

Les sources de xylose seront donc des matières premières riches en xylanes : bois d'angiospermes, notamment bois de hêtre; paille d'avoine (1), noyaux d'abricots (1), téguements des graines de coton (23), rachis de maïs (24 et 26), cellulose de sparte (25), etc...

A partir de ces matières, la préparation du xylose peut être effectuée en deux temps (22). D'abord, isolement de la xylane ou gomme de bois. On la dissout dans la soude diluée à l'ébullition et on la précipite de cette solution par l'alcool ou la liqueur de Fehling. La gomme ainsi obtenue est hydrolysée par les acides dilués à l'ébullition.

Mais il est plus simple, comme l'indique M. G. Bertrand (1), de traiter les matières premières riches en xylanes directement par les acides dilués. Les rendements en xylose cristallisé dépassent souvent 10 p. 100 du poids de la matière première.

Nous utilisons comme source de xylane les noyaux d'a-

bricots, beaucoup moins encombrants à poids égal que les sciures et surtout les pailles, comme le fait remarquer M. G. Bertrand (1). Nous suivons dans ses grandes lignes la technique préconisée par cet auteur.

Nous utilisons également avec avantage les rachis de maïs.

A. — TRAITEMENT DES NOYAUX D'ABRICOTS

Les noyaux privés de leur amande sont pulvérisés.

500 g. de poudre sont humectés par 400 g. d'eau de source. Les grumeaux sont broyés à la main. Vingt-quatre heures après, la poudre gonflée est introduite dans un percolateur et lixiviée par quatre litres d'eau de source contenant 2 p. 100 d'ammoniaque. La masse est essorée, lavée plusieurs fois à l'eau de source sur un grand entonnoir de Büchner, puis introduite dans un ballon en Pyrex de douze litres avec cinq litres d'eau distillée et 85 cm³ d'acide sulfurique. On agite. Le ballon muni d'un réfrigérant à reflux est séparé de la flamme par une toile métallique épaisse. Dès le début de la chauffe la masse rougit et mousse abondamment. Mais cette mousse tombe bientôt et l'ébullition devient régulière. Elle est maintenue durant six heures.

Après refroidissement, le liquide d'hydrolyse jaune clair, à odeur de furfurol, est filtré sur un entonnoir de Büchner. Introduit dans une grande capsule, il est neutralisé par addition de 200 g. de carbonate de calcium. Quand la mousse produite est tombée, le précipité est séparé par filtration. Le liquide verdâtre est acidulé par l'acide acétique jusqu'à virage au jaune clair. Il est additionné de quelques cm³ d'huile de vaseline pour empêcher la mousse et est concentré à 300 cm³ environ par distillation dans le vide.

Le précipité qui s'est formé est alors séparé par filtration. Le filtrat est concentré, par distillation dans le vide jusqu'à consistance sirupeuse. Il est commode de réunir pour les opérations suivantes les sirops provenant de plusieurs traitements semblables.

Le sirop encore tiède, est additionné d'un litre d'alcool à 80 c. environ. Il se forme un abondant précipité gélatineux que l'onessore. La solution alcoolique brune est distillée dans le vide. Le résidu sirupeux cristallise par refroidissement, spontanément ou mieux, sur amorce.

La bouillie cristalline très épaisse est délayée dans un peu d'alcool à 90 c. et la pâte fluide est essorée. Elle laisse sur le filtre le xylose que l'on lave à l'alcool. Le xylose recueilli est presque blanc, il est séché dans le vide sulfurique.

500 g. de noyaux d'abricots donnent ainsi 10 à 12 g. de xylose brut.

Les eaux-mères et les eaux de lavage de plusieurs traitements sont réunies et concentrées. Le résidu est repris, comme plus haut, par l'alcool fort et la solution alcoolique est amenée à consistance sirupeuse. On obtient ainsi une deuxième cristallisation.

Ces opérations répétées trois ou quatre fois permettent de retirer des 500 g. de noyaux mis en œuvre, environ 30 g. de xylose brut.

Les eaux-mères, de plus en plus brunes, sont riches en substances réductrices et actives sur la lumière polarisée, mais ne laissent plus cristalliser de xylose.

Nous avons préparé de la sorte environ 500 g. de xylose brut.

B. — TRAITEMENT DES RACHIS DE MAÏS

Divers auteurs (24 et 26) indiquent que cette matière première fournit facilement 10 à 12 p. 100 de xylose. Nous l'utilisons avec avantage.

Les rachis de maïs sont séchés, coupés au coupe-racines et hachés. Ils sont lessivés à l'eau ammoniacale à 2 p. 100, puis à l'eau pure. Ils sont ensuite séchés. La substance sèche est additionnée de dix fois son poids d'eau contenant par litre 40 cm³ d'acide sulfurique. L'hydrolyse est obtenue par six heures d'ébullition et la suite des opérations est la même que plus haut.

Les liquides obtenus avec le maïs sont beaucoup moins colorés et moussent beaucoup moins que ceux fournis par les noyaux. Enfin, la première cristallisation donne directement un rendement en xylose de 10 p. 100 du maïs sec mis en œuvre. Les eaux-mères ne retiennent qu'une faible quantité de xylose. Leur traitement permet d'amener le rendement à 12 p. 100.

Nous avons préparé de la sorte 120 g. de xylose brut. Les rachis de maïs permettent donc de préparer facilement le xylose avec un bon rendement.

Purification du xylose.

Nous avons suivi la technique indiquée par M. G. Bertrand, Le xylose brut pulvérisé est dissous dans six fois son poids d'alcool à 95 c. bouillant. La dissolution est assez lente. La liqueur jaune clair additionnée de noir animal est portée de nouveau à l'ébullition puis filtrée bouillante.

Le xylose cristallise spontanément par refroidissement. Mais il est préférable d'amorcer la cristallisation et de la trou-

bler par agitation pour avoir des cristaux petits et purs. Les cristaux sont recueillis après deux ou trois jours et séchés dans le vide sulfurique.

Le xylose brut préparé à partir du maïs ou des noyaux d'abricots nous fournit après deux traitements analogues du xylose pur.

La rotation spécifique est déterminée en solution aqueuse. En raison de la mutarotation très forte du xylose, l'observation polarimétrique est effectuée vingt-quatre heures après la dissolution :

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 18^{\circ},7 \text{ (}\alpha = + 2^{\circ}42'; \text{ p} = 1,082; \text{ v} = 15; \text{ l} = 2)$$

Nous obtenons à partir de ce xylose la xylosazone (p. f. 166° au bloc Maquenne) et le xylonobromure de cadmium en suivant les indications de M. G. Bertrand (1).

Mesures.

Dans le cours de nos expériences, les lectures polarimétriques sont effectuées, pour la raie D du sodium au tube de deux décimètres sauf indications spéciales.

Le sucre réducteur est dosé par la méthode de M. G. Bertrand en utilisant les tables de correspondance cuivre-xylose données par cet auteur (2).

III. — LES ALCOOLS

Nous utilisons pour nos expériences les alcools éthylique, méthylique, propylique normal, à différents titres.

Les alcools éthyliques sont préparés par mouillage de l'alcool à 95 c. pur du commerce.

Les alcools méthyliques sont préparés par mouillage de l'alcool méthylique à 98-99 pur du commerce.

Les alcools propyliques sont préparés par mouillage d'un alcool propylique normal pur, anhydre et inactif à la lumière polarisée, que nous possédions au Laboratoire. Les divers échantillons d'alcool propylique normal du commerce que nous nous sommes procurés dans cinq maisons différentes étaient tous lévogyres, certains mêmes assez fortement ($\alpha = -2^\circ$ pour $l = 2$). Leur point d'ébullition était celui de l'alcool propylique normal pur : $97^\circ 4$.

Nous n'avons pas pu les séparer de leur impureté lévogyre par distillation fractionnée sur une colonne Robert et nous avons dû abandonner nos essais sur cet alcool en raison de la difficulté de nous procurer l'alcool propylique pur.

DEUXIÈME PARTIE

Action synthétisante de l'émulsine des amandes sur le xylose en solution dans l'alcool éthylique Synthèse, extraction et étude de l'éthyl-d-xyloside β

CHAPITRE PREMIER

Mise en évidence d'une xylosidase β dans l'émulsine des amandes et recherche des conditions optima de son action

Nous avons vu plus haut que la présence d'une primévérase dans l'émulsine des amandes (9) nous incitait à chercher dans ce produit fermentaire une xylosidase β . C'est dans ce but que nous tentons d'effectuer la synthèse et l'hydrolyse d'un alcool xyloside β .

Tout d'abord, nous examinerons dans ce chapitre l'action de l'émulsine sur le xylose en solution dans l'alcool éthylique.

En effet, il est vraisemblable d'admettre que cet alcool qui est le milieu de choix pour (13), l'action synthétisante de

la glucosidase β sera aussi le plus propice à l'action synthétisante d'une xylosidase β .

EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES

Nous nous sommes assurés tout d'abord que, dans les conditions de nos expériences, l'émulsine n'a aucune action sur le xylose en solution aqueuse : L'addition de 0 g. 50 d'émulsine à 100 cm³ de solution aqueuse de xylose à 2 p. 100 ne modifie aucunement après un mois la teneur de la solution en sucre réducteur, non plus que son action sur la lumière polarisée, si l'on tient compte de la rotation gauche due à l'émulsine.

D'autre part, on n'observe aucune synthèse en l'absence d'émulsine dans une solution alcoolique de xylose : une solution de xylose à 2 p. 100 dans l'alcool éthylique à 95 c. conservée durant deux mois, soit à la température du laboratoire, soit à celle de 30° ou de 50° conserve sa concentration en sucre réducteur ; son action sur la lumière polarisée reste la même.

Ceci étant posé, nous avons pu étudier l'action de l'émulsine sur le xylose en solution dans l'alcool éthylique. Nous rechercherons d'une part l'influence du titre alcoolique du solvant, d'autre part l'influence de la température de réaction sur le phénomène synthétique. Enfin nous étudierons l'influence de la quantité de ferment, soit qu'on l'ajoute en une seule fois, soit qu'on le renouvelle fréquemment. Ces études nous permettront d'établir les conditions optima de l'action synthétisante de la xylosidase β .

I. — INFLUENCE DU TITRE ALCOOLIQUE ET DE LA TEMPÉRATURE

Les expériences sont effectuées sur 100 cm³ de solution de xylose à 2 p. 100 environ dans des alcools de différents titres. Pour l'alcool à 95 c., la concentration en xylose est de 1,33 p. 100 environ, correspondant à la saturation, à la température ordinaire.

La rotation polarimétrique est mesurée et le sucre réducteur est dosé, au début, au cours, et à la fin des expériences. Chaque essai est additionné de 0 g. 50 d'émulsine pour 100 cm³ de solution. Les flacons bien bouchés sont agités de temps en temps.

Remarques :

I. — La mutarotation du xylose en solution aqueuse est très intense. Elle existe également quoique moins accentuée pour les solutions alcooliques de xylose. Comme on l'observe généralement pour les sucres de la série D, le pouvoir rotatoire spécifique d'équilibre croît avec le titre alcoolique du solvant.

II. — L'émulsine se dissout partiellement dans les alcools de titre faible et communique au liquide une rotation lévogyre. Ce phénomène n'a pas lieu pour les alcools de titre élevé : 70 c. et au-dessus.

Nous effectuons trois séries de dix expériences sur des solutions de xylose dans des alcools titrant de 10 c. à 95 c. La première série est maintenue à la température du laboratoire, la deuxième à la température de 30°, la troisième à celle de 50°. De plus, nous effectuons deux expériences à la température de 40° sur des solutions de xylose dans des alcools à 90 c. et 95 c.

Toutes ces expériences sont résumés dans les tableaux ci-contre (Tableaux I, II, III, IV).

Nous conviendrons que :

α désigne la rotation polarimétrique observée au tube de 2 dcm.

S. R. désigne la teneur en sucre réducteur pour 100 cm³.

D. S. R. désigne la variation du sucre réducteur.

Δ désigne le sucre réducteur disparu pour 100 parties de sucre mis en œuvre.

I désigne l'indice de réduction enzymolytique tel que l'a défini Em. Bourquelot (4).

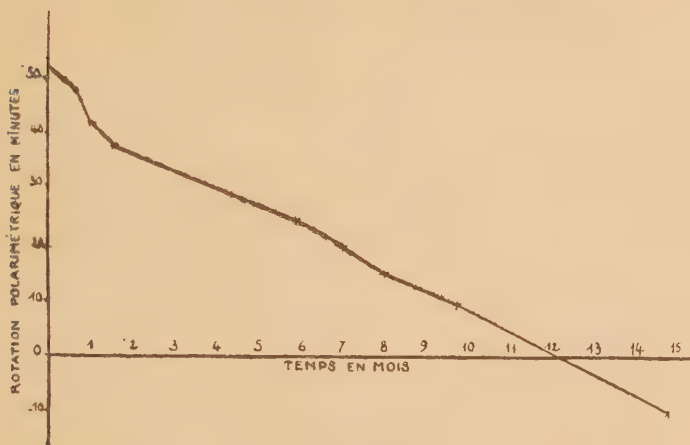
L'émulsine des essais ayant séjourné huit jours à la température de 50° étant recueillie, son action hydrolysante sur le méthylglucoside β en solution aqueuse, comparée à celle d'une même quantité d'émulsine neuve s'est montrée très atténuée. Dans l'espoir d'obtenir des actions plus marquées, nous avons ajouté à chacun des essais effectués à la température de 50°, 0 g. 50 de nouvelle émulsine.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L'examen de ces tableaux, nous montre qu'il se produit dans tous les cas un retour de la déviation polarimétrique vers la gauche. Pour les alcools de titre élevé ce retour ne peut pas être attribué à la solubilisation de l'émulsine.

Nous observons également dans tous les cas une disparition du sucre réducteur. Quelle que soit la température de la réaction, ce phénomène est surtout accentué pour les alcools de titre élevé : 80 c., 90 c., 95 c. Dans l'alcool à 95 c., à la température de 30°, la diminution du sucre réducteur est notable et la déviation devient lévogyre. Les variations de la

déviatiun polarimétrique en fonction du temps, exprimées par la courbe ci-contre représentent la marche du phénomène. On voit que l'allure, rapide au début, se ralentit bientôt et que le phénomène garde une intensité constante comme le montre la partie sensiblement rectiligne de la courbe.



A la température du laboratoire, l'action de l'émulsine est extrêmement faible et lente. A la température de 30°, elle est un peu moins lente et, du moins pour les alcools de titre fort, demeure très prolongée, puisqu'après quatorze mois, elle ne paraît pas arrêtée dans l'alcool à 95 c. A la température de 40°, l'action de l'émulsine moins lente qu'à 30°, n'était pas terminée après trois mois, à l'arrêt de nos expériences.

Enfin à la température de 50°, l'action de l'émulsine est rapide, mais brève. Le ferment y est bientôt altéré après une courte période d'activité.

En résumé, l'action de l'émulsine sur le xylose en solution dans l'alcool éthylique se manifeste par une diminution du sucre réducteur et un retour de la déviation polari-

métrique vers la gauche. L'élévation de la température accélère cette action jusqu'à ce que soit atteinte la température mortelle pour le ferment en présence d'alcool. Cette température est voisine de 50° . Enfin les phénomènes sont d'autant plus intenses que le titre alcoolique est plus élevé. Nous concluons donc que les conditions optima d'action de l'émulsine sur le xylose en solution dans l'alcool éthylique sont réalisées par un séjour prolongé à une température de 40° pour un alcool titrant 95 c.

II. — INFLUENCE DE LA QUANTITÉ D'ÉMULSINE

Les expériences sont effectuées dans des conditions analogues aux précédentes sur des solutions de xylose dans des alcools éthyliques à 90 c. et 95 c.

A) 100 cm³ de solution de xylose sont additionnés de 0 g. 50 d'émulsine tous les trois jours et maintenus à la température de 50° . Les flacons sont agités mécaniquement à raison de deux à trois retournements par minute. Les expériences sont arrêtées à la seizième addition d'émulsine, chaque flacon en ayant alors reçu huit grammes.

B) 100 cm³ de solution de xylose dans l'alcool à 95 c. sont additionnés de 10 g. d'émulsine. Le flacon maintenu à la température de 30° est agité de temps en temps. Au bout de deux mois, l'action de l'émulsine paraissant terminée, le flacon est porté à l'étuve à la température de 50° .

Les expériences sont résumées dans les tableaux ci-contre (tableaux V et VI).

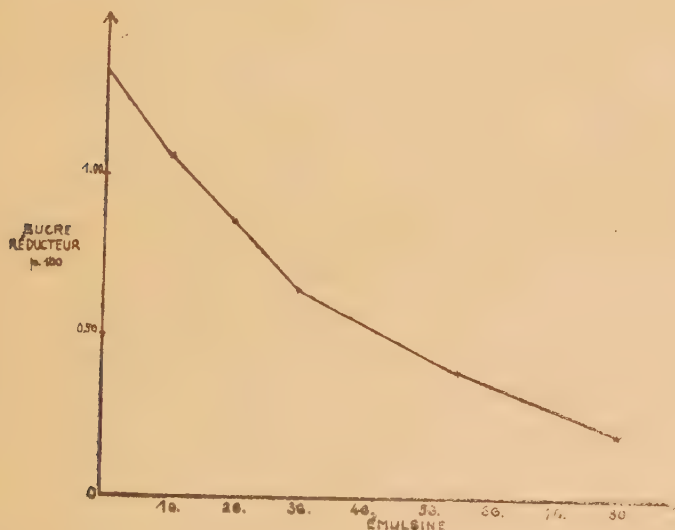
INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L'examen du tableau V nous montre que dans ce cas les solutions accusent rapidement un retour assez considérable

de la déviation polarimétrique vers la gauche. Les liquides deviennent même lévogyres.

Il est disparu plus de sucre réducteur dans l'alcool à 90 c. que dans l'alcool à 95 c. mais le rapport du sucre réducteur disparu au sucre réducteur mis en œuvre est plus élevé dans l'alcool à 95 c. que dans l'alcool à 90 c.

L'expérience montre que l'émulsine ayant séjourné trois jours dans l'alcool à 90 c. ou à 95 c. à la température de 50° est devenue pratiquement inactive. A chaque nouvelle addition, l'émulsine ajoutée agit donc comme si elle était seule. La courbe ci-contre exprime pour l'alcool à 95 c. les



variations du sucre réducteur en fonction des quantités d'émulsine ajoutée. On voit que la quantité de sucre réducteur disparu sous l'action d'une même quantité d'émulsine décroît au fur et à mesure que s'avance l'expérience. Ce qui est une conséquence normale de la loi d'action de masse.

L'examen du tableau VI nous montre que dans ce cas également, la déviation polarimétrique devient assez rapidement lévogyre tandis que disparaît une notable proportion du sucre réducteur. Comparant cette expérience à celle réalisée dans les mêmes conditions avec 0 g. 50 d'émulsine (tableau II), nous voyons qu'il faut respectivement huit et quatorze mois dans le second cas pour obtenir le même résultat qu'en quinze jours et un mois dans le premier. Il semble donc qu'il y ait au début de l'expérience proportionnalité entre la vitesse de réaction et la quantité d'émulsine mise en œuvre. Par la suite, la vitesse se ralentit puis s'annule bien que, comme nous avons pu nous en assurer, l'émulsine ne soit pas inactivée. Il est intéressant de remarquer que l'élévation de la température à 50° provoque un renouveau d'activité.

En résumé, d'une façon comme d'une autre, au début des expériences, l'action de l'émulsine sur le xylose en solution dans l'alcool éthylique apparaît comme sensiblement proportionnelle à la quantité de ferment mis en œuvre. Cette proportionnalité n'existe plus à la fin des expériences, ce que l'on peut expliquer par l'approche d'un état d'équilibre.

TABEAU I. — Action de l'émulsine sur le xylose en solution dans l'alcool éthylique
Expériences effectuées à la température du laboratoire

Titre alcoolique	10°		20°		30°		40°		50°		60°		70°		80°		90°		95°	
	α	S.R.	α	S.R.	α	S.R.	α	S.R.	α	S.R.	α	S.R.	α	S.R.	α	S.R.	α	S.R.	α	S.R.
0	45'	2,03	46'	2,05	48'	2,05	56'	2,05	58'	2,04	62'	2,04	66'	1,05	70'	2,03	74'	2,03	52'	1,32
7 jours	32'		36'		42'		50'		58'		62'		66'		68'		72'		50'	
20 jours	32		36'		40'		48'		55'		60'		62'		64'		70'		48'	
3 mois	32'		36'		40'		48'		55'		56'		56'		54'		66'		43'	
6 mois	32'	1,96	36'	1,96	40'	1,95	48'	1,96	55'	1,94	53'	1,94	55'	1,955	55'	1,81	60'	1,68	42'	1,18
D. S. R.	0,07		0,09		0,10		0,09		0,10		0,10		0,095		0,22		0,345		0,141	
Δ	3,4		4,4		4,9		4,4		4,9		4,9		4,6		10,8		17		10,6	

TAELEAU II. — Action de l'émulsine sur le xylose en solution dans l'alcool éthylique
Expériences réalisées à la température de 30°

Titre optique	10°		20°		30°		40°		50°		60°		70°		80°		90°		95°	
	α	S.R.	α	S.R.	α	S.R.	α	S.R.	α	S.R.	α	S.R.	α	S.R.	α	S.R.	α	S.R.	α	S.R.
0	45'	2,05	46'	2,05	48'	2,05	56'	2,05	58'	2,05	62'	2,04	66'	2,05	70'	2,03	74'	2,03	+32'	1,325
8 jours	27'		32'		40'		46'		48'		60'		64'		67'		72'		+30'	
1 mois	26'		34'		36'		42'		47'		56'		62'		62'		62'		+42'	
4 mois	28'	1,96	32'	1,95	34'	1,96	37'	1,96	46'	1,93	54'	1,94	60'	1,855	58'	1,80	50'		-28'	
8 mois															58'		44'		+42'	
14 mois																	42'	1,72	10'	0,807
D S. R	0,0/		0,10		0,09		0,09		0,11		0,10		0,195		0,23		0,31		0,518	
Δ	3,4		4,9		4,4		4,4		5,4		4,09		9,5		11,3		15		64	

TABEAU III. — Action de l'émulsine sur le xylose en solution dans l'alcool éthylique
Expériences effectuées à la température de 50°

Titre alcoolique	10°		20°		30°		40°		50°		60°		70°		80°		90°		95°	
	α	S.R.	α	S.R.	α	S.R.	α	S.R.	α	S.R.	α	S.R.	α	S.R.	α	S.R.	α	S.R.	α	S.R.
Temps	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	45'	2,03 46'	2,05 48'	2,05 48'	2,05 56'	2,05 58'	2,04 62'	2,04 66'	2,05 70'	2,03 74'	2,03 74'	2,03 52'	4,325							
8 jours	30'	36'	40'	40'	45'	52'	58'	60'	64'	68'	68'	68'	68'	68'	68'	68'	68'	68'	68'	68'
Chaque flacon reçoit 0 g. 50 de nouvelle émulsine																				
15 jours	16'	1,965 22'	2,00 28'	2,00 36'	1,95 48'	1,95 54'	1,97 60'	1,88 62'	1,78 62'	1,79 30'	1,06									
D. S. R.	0,065	0,05	0,05	0,10	0,09	0,11	0,16	0,24	0,24	0,27										
Δ	3.2	2,4	2,4	4,8	4,4	5	8	12	12	20										

TABLEAU IV. — Action de l'émulsine sur le xylose en solution dans l'alcool éthylique. Expériences réalisées à la température de 40°

Titre alcoolique	90°		95°	
Temps	α	S. R.	α	S. R.
0	74'	2,03	52'	1,325
3 jours	72'		49'	
un mois	56'		38'	
3 mois	48'	1,72	22'	0,96
D. S. R.	0,314		0,365	
Δ	15,4		27,5	

**TABLEAU V. — Action de l'émulsine sur le xylose
en solution dans l'alcool éthylique**
Expériences effectuées à la température de 50°
l'émulsine étant renouvelée tous les trois jours

Titre alcoolique	90°		95°	
Emulsine	α	S. R.	α	S. R.
0	+ 74'	2,03	+ 52'	1,325
0 g. 50	+ 64'		+ 40'	
0 g. 50	+ 56'		+ 30'	1,058
0 g. 50	+ 48'		+ 20'	
0 g. 50			+ 14'	0,866
0 g. 50			+ 8'	
0 g. 50	+ 26'		+ 2'	0,637
0 g. 50				
0 g. 50	+ 16'		— 5'	
0 g. 50	+ 10'		— 10'	
0 g. 50				
0 g. 50			— 20'	0,393
0 g. 50				
0 g. 50				
0 g. 50				
0 g. 50	— 10'	0,570	— 40'	0,208
D. S. R.	1,459		1,117	
Δ	71,8		88,3	
I	1042		630	

TABLEAU VI. — Action de l'émulsine sur le xylose en solution dans l'alcool éthylique.

Expérience effectuée à la température de 37° avec 10 g. d'émulsine pour 100 cm³ de solution.

Temps	α	S. R.
0	+ 55'	1,385
15 jours	+ 10'	
Un mois	— 9'	
Un mois et demi	— 24'	
2 mois	— 26'	0,359
La température est élevée à 50°		
4 jours	— 40'	0,217
D S. R.		1,168
Δ		84
I		739

CONCLUSIONS.

Les résultats obtenus au cours de ces expériences permettent de tirer les conclusions suivantes :

L'émulsine des amandes, agissant sur le xylose en solution dans l'alcool éthylique produit une disparition de sucre réducteur et un retour de la rotation polarimétrique vers la gauche. Ce retour, dans les conditions les meilleures est tel que les liquides d'expérience dévient à gauche la lumière polarisée. Il se forme donc une substance lévogyre.

Il est vraisemblable que cette substance lévogyre se forme aux dépens du xylose, et est constituée par l'éthylxyloside β , dont l'apparition est attribuable à la présence d'une xylosidase β dans l'émulsine des amandes.

Pour confirmer cette présence, nous allons tenter d'effectuer à l'aide de l'émulsine la synthèse biochimique et l'extraction de l'éthylxyloside β . Nous nous placerons dans les conditions optima définies plus haut : La solution du xylose sera faite dans un alcool éthylique de titre fort : 90 c. ou 95 c. La température de choix sera soit 50°, et l'on ajoutera alors l'émulsine par petites fractions, soit 30° ou 40° et l'on aura intérêt à ajouter en une seule fois toute l'émulsine. Il nous faudra disposer d'une quantité assez considérable de ce ferment, et, dans le but de l'économiser, nous ne chercherons pas à pousser la synthèse au-delà d'une disparition de 50 p. 100 du sucre mis en œuvre puisque l'efficacité de l'émulsine décroît à la fin des expériences.

CHAPITRE II

Synthèse, extraction et étude de l'éthylxyloside β

I. — SYNTHÈSE BIOCHIMIQUE

Dans une première tentative, un litre d'alcool éthylique à 95 c. contenant en solution 1 g, 286 de xylose p. 100 cm³ et présentant une rotation polarimétrique stable de + 51' pour $l = 2$ est placé à l'étuve à la température de 50°. Il est agité mécaniquement à raison de deux à trois retournements par minute après avoir été additionné de deux grammes d'émulsine tous les deux jours. La marche de la synthèse est suivie au polarimètre. L'expérience est arrêtée après la trentième addition. Le flacon a reçu en tout 60 g. d'émulsine. La rotation est devenue gauche : $\alpha = - 10'$. Le sucre réducteur est de 0 g. 532 p. 100 cm³. Il en est donc disparu 0 g. 754. Le liquide est fortement coloré en jaune.

Une deuxième tentative est effectuée sur un demi litre de solution dans des conditions analogues.

II. — EXTRACTION

La solution alcoolique est séparée de l'émulsine par filtration sur un entonnoir de Büchner. L'émulsine est lavée à l'alcool sur le filtre et l'alcool de lavage est réuni au filtrat.

Les liqueurs alcooliques sont distillées à sec dans le vide sans que la température dépasse 60° . Le résidu est repris par 25 cm^3 d'eau distillée tiède. Le sirop obtenu est refroidi et additionné de 150 cm^3 d'un lait de chaux à 10 p. 100. Le mélange est agité de temps en temps. Le xylose non transformé se combine à la chaux. Après vingt minutes de contact, le liquide est additionné de 1 l. 250 d'alcool à 95 c. On agite. La combinaison du xylose et de la chaux est insoluble alors que le xyloside se dissout. Le liquide laiteux est filtré. Cette filtration est assez lente.

La liqueur alcoolique est distillée à sec dans le vide sans que la température dépasse 60° . Le résidu est épuisé par 50 cm^3 d'éther acétique anhydre à l'ébullition au réfrigérant à reflux. Il s'y dissout très vite, même à froid et presque complètement. Nous épuisons cependant une seconde fois par 20 cm^3 d'éther acétique. Les liqueurs éthéro-acétiques réunies dans un petit ballon sont distillées à siccité. Le ballon est placé dans le vide sulfurique pendant vingt-quatre heures pour dessécher complètement l'extrait. Aussitôt retiré du vide, celui-ci est épuisé par 100 cm^3 de benzène pur et sec au réfrigérant à reflux. La solution benzénique est filtrée bouillante et recueillie en un vase bien sec bouchant hermétiquement. Par refroidissement apparaissent spontanément sur les parois du vase de très fines aiguilles blanches se groupant bientôt en une masse feutrée. Deux nouveaux épuisements de l'extrait avec 20 cm^3 de benzène chacun fournissent également des cristaux.

Si l'on attend trop longtemps pour les recueillir, ces cristaux, absorbant des traces d'humidité, peuvent se transformer en un sirop au sein du benzène. Il faut donc opérer rapidement. On favorise la cristallisation en refroidissant le

vase et en amorçant par grattage des parois. La cristallisation est toujours peu abondante. Au bout d'une demi heure, les cristaux sont recueillis sur un petit entonnoir de Büchner, lavés au benzène, séchés dans le vide sulfurique et conservés en vase bien bouché.

Le rendement est très faible. Dans le premier cas, pour 7 g, 54 de xylose disparu au cours de la synthèse il a été obtenu 0 g. 90 de produit cristallisé; dans le second, pour 3 g. 60 de xylose disparu, 0 g. 60 de xyloside.

La purification du xyloside se fait aisément par deux ou trois cristallisations au sein du benzène où il est légèrement soluble à l'ébullition et très peu soluble à froid.

III. — ETUDE DE L'ÉTHYLXYLOSIDE β

L'éthylxyloside β est hygroscopique comme son homologue l'éthylglucoside β (6-13). Il est extrêmement soluble dans l'eau, très soluble à froid dans les alcools méthylique et éthylique absolus, dans l'acétone anhydre, l'ester acétique anhydre et dans la plupart des solvants usuels. Nous avons vu sa légère solubilité dans le benzène bouillant qui nous a permis de l'obtenir cristallisé. L'éther officinal ne le dissout pas.

Le point de fusion instantané de l'éthylxyloside β bien sec, déterminé au Bloc Maquenne est de $+ 95^{\circ}$. Mais une trace d'humidité l'abaisse considérablement.

Son pouvoir rotatoire spécifique est déterminé pour la raie D du sodium à la température de 20° .

$$[\alpha]_D^{20} = -62^{\circ},8 \quad (\alpha = -2^{\circ}20, p. = 0,4643, v = 25; i = 2)$$

Son indice de réduction enzymolytique tel que l'a défini Em. Bourquelot (4) est calculé :

Pour des solutions aqueuses :

$$I = \frac{150 \times 100}{2 \times 0,178 \times 62,8 + 2 \times 0,150 \times 18,7} = 536$$

Et, pour des solutions dans l'alcool éthylique à 95 c. en tenant compte de l'exaltation du pouvoir rotatoire du xylose dans ce solvant :

$$I = \frac{150 \times 100}{2 \times 0,178 \times 62,8 + 2 \times 0,150 \times 32,6} = 466$$

L'éthylxyloside β ne réduit pas la liqueur cupro-alcaline.

Hydrolyse acide de l'éthylxyloside.

10 cm³ d'une solution aqueuse contenant 1,86 p. 100 d'éthylxyloside β sont additionnés de 10 cm³ d'acide sulfurique à 6 p. 100. Le mélange renfermant 0 g. 93 p. 100 de xyloside et présentant une rotation de — 1°10' est chauffé en tube scellé pendant trois heures au bain-marie bouillant. Après refroidissement, le sucre réducteur est dosé : 0 g. 774 p. 100 et la rotation polarimétrique observée : $\alpha = + 16'$.

Il est donc apparu pour un retour de la rotation vers la droite de 1°26', 0 g. 774 p. 100 de sucre réducteur. L'indice de réduction enzymolytique est $\frac{774}{1,43} = 541$. Il est peu différent de l'indice théorique.

0 g. 774 p. 100 de xylose proviennent de 0 g. 918 p. 100 d'éthylxyloside β . L'hydrolyse acide est donc totale aux erreurs d'expérience près.

Hydrolyse diastasique par l'émulsine.

20 cm³ d'une solution aqueuse contenant 0 g. 796 p. 100 d'éthylxyloside β et présentant une rotation polarimétrique de -1° sont additionnés de quelques gouttes de toluène et de 0 g. 50 d'émulsine. Le flacon bien bouché est placé à l'étuve à la température de 30° en même temps qu'un flacon témoin contenant 0 g. 50 d'émulsine pour 20 cm³ d'eau distillée toluénée. Les deux flacons sont agités tous les jours. Quinze jours après le début de l'expérience, les liquides sont déféqués par l'extrait de Saturne. Le plomb est éliminé par le sulfate de sodium et le volume est complété à 25 cm³. Le sucre réducteur est dosé et la déviation polarimétrique observée. Les résultats sont ramenés au volume primitif.

Il s'est produit 0 g. 496 de sucre réducteur pour 100 cm³. La rotation est de $-7'$, soit un retour de 53' vers la droite. L'indice de réduction enzymolytique trouvé est $\frac{496}{0,88} = 563$. Il est peu différent de l'indice théorique.

0 g. 496 de xylose proviennent de l'hydrolyse de 0 g. 588 d'éthylxyloside β . L'émulsine a donc hydrolysé 74 p. 100 du xyloside mis en œuvre.

Dans une autre expérience effectuée dans les mêmes conditions, mais prolongée huit jours seulement, l'hydrolyse n'atteint que 40 p. 100 du xyloside.

Dans les liquides d'hydrolyse acide et diastasique, le sucre réducteur apparu est identifié avec le xylose. Il fournit, en effet, du xylonobromure de cadmium et donne une osazone identifiée par son aspect microscopique et son point de fusion avec la xylosazone préparée à partir du xylose pur.

Remarque. — Nous connaissons maintenant le pouvoir rotatoire et l'indice de réduction enzymolytique et l'éthylxyloside β . Appliquons ces données à l'interprétation des expériences exposées ci-dessus et dans le précédent chapitre.

Nous voyons que les indices de réduction enzymolytique trouvés au cours des hydrolyses acides et diastasique correspondent aux erreurs d'expérience près à l'indice théorique. Il en est de même au cours de la synthèse réalisée à la température de 30° dans l'alcool à 95 c. avec 0 g. 50 d'émulsine (Tableau II).

Mais le plus souvent, et notamment dans les synthèses qui nous ont permis d'extraire l'éthylxyloside β , l'indice trouvé diffère de l'indice théorique. Sa valeur oscille généralement autour de 750 (Tableaux V, VI). Il y a lieu d'envisager dans ce cas l'apparition d'un phénomène secondaire, superposé à la synthèse du xyloside et comportant une disparition du sucre réducteur. Nous étudierons plus loin (voir page 57) ce phénomène. Remarquons seulement ici que la faiblesse des rendements obtenus au cours de l'extraction de l'éthylxyloside β s'explique ainsi naturellement. Notons aussi que dans le cas du xylose, contrairement à ce qui se passe pour le glucose, au cours des expériences de synthèse la disparition de sucre réducteur et la diminution de la rotation droite ne constituent pas à eux seuls une preuve de la formation d'hétéroside et ne peuvent servir à la mesurer. Néanmoins, lorsque la valeur de l'indice trouvé ne s'écarte pas trop de celle de l'indice théorique, ces données permettent d'apprécier la marche de la synthèse.

La connaissance de l'indice nous oblige à remanier quelque peu les conclusions du chapitre précédent, et nous voyons que les conditions optima de synthèse de l'éthylxyloside β à

l'aide de l'émulsine seront celles du tableau II : action lente et prolongée d'une petite quantité d'émulsine sur le xylose en solution dans l'alcool à 95 c. à la température de 30°. On obtient ainsi, avec un indice voisin de l'indice théorique, le meilleur rendement par rapport à l'émulsine et au xylose mis en œuvre. Mais cette méthode est trop longue pour être appliquée pratiquement à la préparation de l'éthylxyloside β par synthèse biochimique.

Essai de synthèse de l'éthylxyloside β par voie chimique.

Nous avons essayé de préparer par voie chimique l'éthylxyloside β , afin de le comparer à celui dont nous avons réalisé la synthèse à l'aide de l'émulsine. Nous espérons en obtenir une quantité suffisante qui nous permette de poursuivre l'étude de son hydrolyse diastasique.

Nous suivons une méthode calquée sur celle employée par Em. Fischer (15) pour préparer les méthylxylosides : chauffage de 40 heures à la température de 100°, en tubes scellés, d'une solution de xylose à 10 p. 100 dans l'alcool éthylique à 95 c. contenant 1,25 p. 100 de gaz chlorhydrique.

Après ce temps, le xylose est presque entièrement combiné à l'alcool, et cette combinaison, très soluble dans l'ester acétique, communique au liquide une rotation fortement dextrogyre. Il s'est vraisemblablement formé, comme d'ordinaire dans cette méthode, un mélange des isomères α et β avec prédominance du xyloside α . Mais tous nos efforts pour retirer de ce mélange l'éthylxyloside β cristallisé sont demeurés vains.

Nous n'avons pas essayé la méthode des sucres acétologénés.

CONCLUSIONS.

Comme nous nous l'étions proposé au début de ce travail, nous avons réussi à mettre en évidence la présence d'une xylosidase β dans l'émulsine des amandes, fait qui, à notre connaissance n'avait pas encore été signalé.

C'est, avec la glucosidase β , la galactosidase β l'arabinosidase α , la lactase, la primevérosidase, la primevérase, une ase de plus à l'actif de ce produit fermentaire.

Mais nous avons vu que si l'émulsine contient une xylosidase β , elle en contient fort peu comparativement à sa teneur en glucosidase β . Aussi, pour mettre l'action de ce nouveau ferment nettement en évidence, il nous a fallu prolonger les expériences et utiliser des quantités relativement considérables d'émulsine. Nous avons alors observé des phénomènes accessoires qui ont mis en lumière l'importance de l'indice de réduction enzymolytique dans l'appréciation des phénomènes synthétiques.

Nous avons déterminé les conditions optima d'activité de la xylosidase β de l'émulsine des amandes. Nous avons vu qu'elles comportaient une température de 40° comme la plupart des ases de l'émulsine, et un titre alcoolique élevé : 95 c. comme pour l'arabinosidase α (10). La glucosidase β qui est très active nécessite un titre alcoolique optimum de 70 c. (13).

Utilisant ces données, nous avons effectué à l'aide de l'émulsine des amandes la synthèse biochimique de l'éthylxyloside β que nous avons ainsi obtenu pour la première fois à l'état cristallisé. La synthèse chimique donne naissance aux éthylxylosides α et β . Mais leur séparation ne nous a pas été possible. Nous avons donné les propriétés et les constantes

physiques de l'éthylxyloside β et en avons réalisé les hydrolyses acide et diastasique à l'aide de l'émulsine, hydrolyses qui en confirment la constitution.

La présence d'une xylosidase β dans l'émulsine des amandes se trouve donc définitivement établie par le processus diastasique réversible, synthétisant et hydrolysant, mis en évidence au sujet de l'éthylxyloside β .

L'étude du méthylxyloside β va nous permettre de confirmer la présence de la xylosidase β dans l'émulsine des amandes.

TROISIEME PARTIE

Recherches sur l'hydrolyse et sur la synthèse biochimique du méthylxyloside β à l'aide de l'émulsine des amandes

I. — PRÉPARATION ET PROPRIÉTÉS DU MÉTHYLXYLOSIDE β

Em. Fischer a isolé le méthylxyloside β à l'état pur et cristallisé (15). La méthode de préparation indiquée par cet auteur met à profit l'action de l'acide chlorhydrique pour condenser le xyloëse avec l'alcool méthylique. Elle fournit un mélange des deux xylosides isomères α et β où prédomine l'isomère α , mais d'où l'on sépare aisément l'isomère β . Nous employons cette méthode.

50 g. de xylose sont dissous à l'ébullition dans 500 cm³ d'alcool méthylique absolu contenant 1,25 p. 100 de gaz chlorhydrique sec (ou additionné d'une quantité équivalente d'acide chlorhydrique officinal). La solution encore tiède est répartie en tubes que l'on scelle. Les tubes sont chauffés pendant 40 heures à la température de 100°. Il ne reste plus alors que 2 p. 100 de sucre non combiné. Le liquide jaune clair est neutralisé par le carbonate d'argent, décoloré par le noir animal, filtré et évaporé dans le vide jusqu'à consistance

sirupeuse. Le sirop encore tiède est additionné de son volume d'ester acétique. Après 24 heures de repos en lieu frais, le sirop s'est pris en une masse de cristaux. Ceux-ci apparaissent groupés en superbes rosettes, dans la couche éthéro-acétique. Il est d'ailleurs préférable d'amorcer et de troubler la cristallisation pour obtenir des cristaux plus fins retenant moins d'eaux mères.

Ces cristaux sont recueillis, essorés, lavés à l'ester acétique et desséchés dans le vide sulfurique. Ils sont constitués par le méthylxyloside β impur, retenant un peu de l'isomère α qui, beaucoup plus soluble, reste en grande partie dans les eaux mères.

Le méthylxyloside β est purifié par deux ou trois cristallisations dans l'ester acétique, contenant 10 p. 100 de son volume d'alcool éthylique. Le rendement est d'environ 10 p. 100 du xylose mis en œuvre.

Le chauffage en tube scellé est assez dangereux et occasionne des pertes. Sur le conseil de M. le Professeur Hérissé, nous lui substituons simplement et avec profit le chauffage au bain-marie. La solution alcoolique est contenue dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux, et l'ébullition du liquide est maintenue pendant 40 heures. Il reste un peu plus de xylose non combiné qu'après le chauffage en tubes scellés, mais le liquide reste incolore et le rendement en méthylxyloside β n'est pas diminué.

Le méthylxyloside β se présente en cristaux prismatiques blancs très bien formés, qui, obtenus par une cristallisation lente peuvent atteindre plusieurs centimètres. Il est soluble dans l'eau, l'alcool, l'ester acétique anhydre, l'acétone; il est insoluble dans l'éther. Sa saveur est douce et amère.

Son point de fusion instantané déterminé au bloc Ma-

quenne est de 158°-159°. Em. Fischer indiquait 156-157° (15).

Le pouvoir rotatoire spécifique est déterminé en solution aqueuse.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -65^{\circ},8 \quad (\alpha = -2^{\circ},42'; \text{ p. } 1,025; \text{ v} = 50; \text{ l} = 2)$$

Em. Fischer indiquait $-65^{\circ},9$ (15).

Son indice de réduction enzymolytique est en solution aqueuse de :

$$I = \frac{150 \times 100}{2 \times 65,8 \times 0,164 + 2 \times 18,7 \times 0,150} = 552$$

Le pouvoir rotatoire spécifique du xylose en solution dans l'alcool méthylique à 90 p. 100 en volumes est :

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +29^{\circ},9 \quad (\alpha = +56'; \text{ v} = 100; \text{ p} = 1,56; \text{ l} = 2)$$

Le pouvoir rotatoire spécifique du méthylxyloside β en solution dans l'alcool à 90 p. 100 en volume est :

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -65^{\circ},5 \quad (\alpha = -6^{\circ},42'; \text{ v} = 20; \text{ p} = 1,033; \text{ l} = 2)$$

L'indice de réduction enzymolytique du méthylxyloside β en solution dans ce solvant est donc :

$$I = \frac{150 \times 100}{2 \times 65,05 \times 0,164 + 2 \times 29,9 \times 0,150} = 492$$

Le méthylxyloside β ne réduit pas la liqueur de Fehling. Dans une solution aqueuse renfermant 3 p. 100 d'acide sulfurique, il est complètement hydrolysé après 3 heures de chauffe en tube scellé à la température de 100°.

II. — HYDROLYSE DU MÉTHYLXYLOSIDE β PAR L'ÉMULSINE DES AMANDES

a) En solution aqueuse.

25 cm³ d'une solution aqueuse contenant 1,97 p. 100 cm³

de méthylxyloside β et présentant une rotation de $-2^{\circ}36'$ sont additionnés de 0 g. 50 d'émulsine. Le flacon est placé à l'étuve à la température de 30° en même temps qu'un flacon témoin contenant 0 g. 50 d'émulsine pour 25 cm³ d'eau distillée. Les flacons sont agités tous les jours.

Après trois semaines, la solution renferme 0 g. 664 de sucre réducteur p. 100 cm³, correspondant à 0 g. 726 de méthylxyloside β . Il y a donc eu hydrolyse de 36,8 p. 100 du xyloside mis en œuvre. La déviation lévogyre de l'émulsine défalquée, la rotation de la solution est de $-1^{\circ}17'$ soit un retour de la déviation polarimétrique de $1^{\circ}19'$ vers la droite et un indice $n = \frac{664}{1,31} = 506$ très voisin de l'indice théorique.

Une deuxième expérience est effectuée de la même façon avec un gramme d'émulsine agissant sur 50 cm³ d'une solution aqueuse contenant 2,05 p. 100 de méthylxyloside β présentant une rotation gauche initiale de $-2^{\circ}42'$. Après sept semaines de séjour à l'étuve à 30° une partie aliquote du liquide d'expérience est déféquée au plomb. Le sucre réducteur y est dosé et la déviation polarimétrique est observée. On ramène par le calcul à la concentration primitive. Il est apparu 1 g. 01 p. 100 de sucre réducteur correspondant à 1 g. 10 de méthylxyloside. Il y a donc eu hydrolyse de 54 p. 100 du xyloside mis en œuvre. Au cours de cette hydrolyse, le retour de la rotation polarimétrique vers la droite est de $1^{\circ}58'$ soit un indice de réduction enzymolytique de 517.

Nous voyons que l'émulsine des amandes hydrolyse lentement le méthylxyloside β en solution aqueuse. Dans ses expériences, Em. Fischer (16) faisait agir 0 g. 05 d'émulsine sur deux cm³ de solution aqueuse de méthylxyloside β pendant 48 heures seulement. On comprend que la formation du sucre réducteur puisse dans ces conditions passer inaperçue.

Opérant comparativement avec le méthylglucoside β et le méthylisorhamnoside β , Em. Fischer a observé des hydrolyses relativement très rapides (16, 16 bis, 17). Et pourtant, ces corps sont les plus proches homologues du méthylxyloside β . C'est pourquoi l'auteur concluait à la grande finesse de la spécificité diastasique, ou en d'autres termes, à la grossièreté de nos représentations de la structure de la molécule chimique. Pour réelle que soit l'action hydrolysante de l'émulsine des amandes sur le méthylxyloside β , elle demeure si disproportionnée à celle du même produit fermentaire sur le méthylglucoside β ou le méthylisorhamnoside β , que les conclusions d'Em. Fischer gardent presque toute leur valeur.

b) *En solution alcoolique.*

Avant d'entreprendre l'étude de l'action synthétisante de l'émulsine sur le xylose en solution dans l'alcool méthylique, examinons l'action de l'émulsine sur le méthylxyloside β , en solution dans l'alcool méthylique.

Nous faisons agir pendant sept semaines un gramme d'émulsine sur 50 cm³ de solution de méthylxyloside β à 1 p. 100 environ dans des alcools méthyliques de différents titres : 10, 20, 30, 50; 90 p. 100 en volume.

Des flacons témoins renferment un gramme d'émulsine pour 50 cm³ d'alcool. A l'arrêt des expériences, les liquides sont déféqués au plomb, la rotation polarimétrique est observée et le sucre réducteur est dosé. Toutes corrections faites, les résultats sont consignés dans le tableau VII où M désigne la proportion de méthylxyloside β pour 100 cm³.

TABLEAU VII. — Action hydrolysante de l'émulsine des amandes sur le méthylxyloside β en solution dans l'eau et dans des alcools méthyliques de différents titres

Solvant	Eau distillée			Alcool Méthylique					
				à 10 p. 100.		à 20 p. 100		à 30 p. 100	
	α	M	S. R.	α	M	S. R.	α	M	S. R.
Départ	-2°,42'	2,05	0	-2°,20'	1,84	0	-2°,35'	1,973	-3°,10' 2,438 0
Arrêt	-44'	-	1,01	-1°,55'	-	0,244	-2°,15'	-	-3° 0 0 083
Δ		54		14			9,1		4,5

Dans les alcools forts, à 50 et 90 p. 100 nous n'observons aucune hydrolyse. Dans les alcools faibles par contre, nous observons un retour de la déviation polarimétrique vers la droite et une apparition de sucre réducteur.

Nous voyons que l'action hydrolysante de l'émulsine sur le méthylxyloside β , est fortement affaiblie par la présence d'une petite quantité d'alcool méthylique. Elle diminue rapidement, quand le titre alcoolique croît, pour s'annuler, dans les conditions de nos expériences pour un titre alcoolique de 50 p. 100.

L'hydrolyse est trop lente et trop peu avancée pour que les résultats obtenus correspondent à un état d'équilibre. Il est vraisemblable d'attribuer à l'alcool méthylique une action nocive sur la xylosidase β .

Dans les mêmes conditions expérimentales, l'émulsine n'hydrolyse pas le méthylxyloside β en solution dans l'alcool éthylique à 50 et à 90 p. 100.

III. — ESSAI DE SYNTHÈSE DU MÉTHYLXYLOSIDE β PAR L'ÉMULSINE DES AMANDES

Les expériences sont analogues à celles réalisées plus haut pour la synthèse de l'éthylxyloside β .

Nous faisons varier dans les mêmes conditions le titre de l'alcool méthylique employé, la température de réaction (tableau VIII) et la quantité d'émulsine (tableaux IX et X).

A l'examen de ces tableaux, nous remarquons une diminution de la rotation droite et une disparition de sucre réducteur. Ces phénomènes sont le plus souvent peu intenses. Ils ne prennent une certaine importance que lorsque la quantité d'émulsine ajoutée est relativement considérable. Mais

en aucun cas la rotation des liquides en expérience ne devient gauche. Enfin l'indice de réduction enzymolytique trouvé est très différent de l'indice théorique.

A la température de 30° l'action de l'émulsine sur le xylose s'arrête très vite dans l'alcool méthylique alors qu'elle était très prolongée dans l'alcool éthylique. L'alcool méthylique serait donc plus nocif pour la xylosidase β que l'alcool éthylique, comme cela a été montré pour la glucosidase β (13 et 29).

Néanmoins, deux expériences sont tentées, chacune sur 500 cm³ de solution de xylose dans l'alcool méthylique à 90 p. 100 en volume. Le premier flacon reçoit 50 gr. d'émulsine et est placé à l'étuve à la température de 37°. Le deuxième flacon est placé à l'étuve à la température de 50°. Il reçoit tous les deux jours deux grammes d'émulsine jusqu'à concurrence de 50 g. Les expériences sont arrêtées après deux mois. Leurs résultats sont en tout point analogues à ceux des expériences résumées dans les tableaux IX et X. Nous tentons cependant l'extraction du xyloside, de la même façon que pour l'éthylxyloside β . Le xylose est éliminé par la chaux. Le liquide filtré ne dévie pas la lumière polarisée. Distillé à sec, il laisse un résidu brun peu important et d'ailleurs insoluble dans l'ester acétique. Il n'y a pas trace de méthylxyloside, l'indice de réduction enzymolytique trouvé et l'absence de rotation gauche nous le faisaient prévoir.

Pour mieux nous en assurer nous réalisons l'expérience suivante : nous prélevons 20 cm³ de la solution provenant de l'expérience résumée dans le tableau IX, solution qui contenait primitivement 1,56 p. 100 de xylose et n'en contient plus que 0,86 p. 100. Ces 20 cm³ sont évaporés à sec dans une capsule et le résidu est repris par 20 cm³ d'eau distillée con-

TABEAU VIII. — Action de l'émulsine sur le xylose en solution dans l'alcool méthylique
Influence du titre alcoolique et de la température

Titre alcoolique	30 p. 100				60 p. 100				90 p. 100			
	30°		50°		30°		50°		30°		50°	
	α	S. R.	α	S. R.	α	S. R.	α	S. R.	α	S. R.	α	S. R.
0	42'	1,878	42'	1,878	54'	1,852	54'	1,852	56'	1,560	56'	1,560
8 jours	38'		32'		52'		53'		52'		48'	
1 mois	36'		32'	1,830	48'	1,640	53'	1,795	48'		48'	1,480
3 mois	36'	1,750			4°				48'	4,450		
D. S. R.	0,128		0,048		0,212		0,057		0,110		0,08	
Δ	7		2,5		11,4		3		7		5,1	

TABLEAU IX. — Action de l'émulsine sur le xylose en solution dans l'alcool méthylique à 90 p. 100.
Expérience effectuée à la température de 50°, l'émulsine étant renouvelée tous les trois jours.

Emulsine	α	S. R.
0	56'	1,560
0 g. 50	48'	1,480
1 g.	43'	
1 g.	37'	
1 g.	32'	
1 g.		
1 g.		
1 g.	16'	0,860
D. S. R.		0.700
Δ		44,9
I		1066

TABLEAU X. — Action de l'émulsine sur le xylose en solution dans l'alcool méthylique à 90 p. 100.
Expérience effectuée à la température de 30° avec 10 g d'émulsine pour 100 cm³ de solution.

Temps	α	S. R.
0	56'	1,560
15 jours	20'	
1 mois	12'	
2 mois	12'	0,638
D. S. R.		0,922
Δ		59,1
I		1317

tenant 3 p. 100 d'acide sulfurique. Après 3 heures de chauffage en tube scellé à la température de $+ 100^{\circ}$, la solution contient encore 0,87 p. 100 de xylose. Or, nous avons vu que dans ces conditions l'hydrolyse du méthylxyloside β était totale. S'il n'est pas apparu de sucre réducteur après ce traitement, c'est que le liquide ne contenait pas de méthylxyloside β .

La même expérience répétée plusieurs fois, nous a toujours fourni le même résultat.

Nous en concluons que, dans les conditions de nos expériences, l'émulsine ne réalise pas la synthèse du méthylxyloside β . Cependant, elle provoque la disparition d'une partie et parfois de la presque totalité du xylose mis en œuvre. Ce phénomène n'a pas lieu en l'absence d'émulsine, ni dans les solutions aqueuses de xylose, comme le prouvent les expériences préliminaires relatées à la page 24. Pour les solutions de xylose dans l'alcool éthylique, ce même phénomène se superposant à la synthèse de l'éthylxyloside modifie la valeur de l'indice de réduction enzymolytique.

Que devient le xylose disparu ? La nécessité de la présence de l'alcool fait tout d'abord penser à une condensation soit sous forme d'holoside, biose ou xylane, soit sous forme d'hétéroside. Mais nous avons vu que le produit de la transformation du xylose n'est pas hydrolysé par les acides. Lors du traitement par la chaux, il accompagne le xylose. Le sirop provenant de l'évaporation des liquides d'expérience est acide. Neutralisé par le carbonate et l'oxyde de cadmium, il ne donne pas avec le bromure de ce métal le précipité de xylobromure de cadmium. Nous n'avons pas pu mettre en évidence l'acide trioxyglutarique par la formation de son sel de calcium.

Enfin, ni l'addition à la solution alcoolique de xylose, d'un excès de carbonate de calcium, ni celle de quelques gouttes de la solution de bisulfite de soude du commerce ne modifient l'action de l'émulsine.

CONCLUSIONS.

En résumé, nous n'avons pas pu identifier le ou les produits résultant de l'altération du xylose dans ses solutions méthyliques sous l'influence de l'émulsine. Nous n'avons pu empêcher cette altération. La synthèse biochimique du méthylxyloside β n'a pas été réalisée. Nous attribuons cet insuccès, d'abord à la nocivité de l'alcool méthylique vis-à-vis de la xylosidase β de l'émulsine des amandes, ensuite, à la transformation du xylose, au sein du solvant, en un corps que nous n'avons pu caractériser.

Néanmoins, la présence de la xylosidase β dans l'émulsine a été mise en évidence par son action hydrolysante sur le méthylxyloside β , ce pouvoir hydrolysant est faible; c'est pourquoi Em. Fischer ne l'avait pas reconnu. Pour des raisons probablement analogues, nous n'avons pu établir le pouvoir synthétisant de la xylosidase β sur le xylose en solution dans l'alcool méthylique, mais il semble permis de penser que des conditions expérimentales convenables permettront de prouver son existence ainsi que nous l'avons fait dans le cas de l'alcool éthylique.

QUATRIÈME PARTIE

Etude de l'action de l'émulsine sur le xylose en solution dans l'alcool propylique normal

L'alcool propylique employé est l'alcool propylique normal pur, inactif à la lumière polarisée. Les expériences sont effectuées, comme dans le cas des alcools éthylique et méthylique sur des solutions de xylose dans les alcools à différents titres : 30, 60, 90 p. 100 en volume, aux températures de 30° et 50° avec 0 g. 50 d'émulsine pour 100 cm³ de solution. Elles sont résumées dans le tableau XI. L'influence de la quantité d'émulsine à 30° et 50° est également étudiée : tableaux XII et XIII.

Nous voyons à l'examen de ces tableaux que l'émulsine agissant sur le xylose en solution dans l'alcool propylique provoque une disparition du sucre réducteur et un retour de la rotation polarimétrique vers la gauche. Ces phénomènes ont une intensité maximum dans les conditions du tableau XIII : Action d'une forte quantité d'émulsine sur le xylose en solution dans l'alcool à 90 p. 100 à la température de 30°. La déviation polarimétrique y est même devenue lévogyre.

20 cm³ du liquide provenant de cette expérience sont évaporés à sec. Le résidu est repris par 20 cm³ d'eau distillée renfermant 3 p. 100 d'acide sulfurique. La solution est chauff-

fée en tube scellé pendant trois heures à la température de 100°. Le liquide assez fortement coloré ne permet pas un examen polarimétrique. Le sucre réducteur y est dosé : 0 g. 582 p. 100. Il est donc apparu 0 g. 336 de sucre réducteur provenant vraisemblablement de l'hydrolyse du propylxyloside formé sous l'action de l'émulsine. Or, l'émulsine a fait disparaître 1 g. 335 de sucre réducteur. On peut penser qu'à la synthèse du propylxyloside se superpose un phénomène analogue à celui observé dans les alcools éthylique, et surtout méthylique, consistant en une disparition du xylose.

Ne pouvant pas nous procurer d'alcool propylique normal pur, nous n'avons pu poursuivre ces expériences de façon à isoler le propylxyloside β formé par la synthèse. L'obtention de quelques cristaux très impurs de propylxyloside nous permet de penser que sa préparation est réalisable.

TABLEAU XI. — Action de l'émulsine sur le xylose en solution dans l'alcool propylique normal
Influence du titre alcoolique et de la température

Titre alcoolique	30 p. 100				60 p. 100				90 p. 100			
	30°		50°		30°		50°		30°		50°	
	α	S. R.	α	S. R.	α	S. R.	α	S. R.	α	S. R.	α	S. R.
Départ	50'	1,895	50'	1,895	52'	1,720	52'	1,720	58'	1,480	58'	1,580
8 jours	40'		36'		48'		48'		56'		48'	
1 mois	36'		36'	1,852	48'		48'	1,708	50'		48'	1,450
3 mois	36'	1,700			48'	1,600			38'	1,380		
9 mois									28'	1,236		
D S. R.	0,195		0,043		0,120		0,012		0,344		0,130	
Δ	10,2		2,2		6,9		0,7		21,7		8,2	

TABLEAU XII. — Action de l'émulsine sur le xylose en solution dans l'alcool propylique à 90 p. 100. Expérience effectuée à la température de 50° en renouvelant l'émulsine tous les trois jours.

Emulsine	α	S. R
0,50	58'	1,580
0,50	48'	
1,00	42'	
1,00	38'	
1,00	33'	
1,00		
1,00	11'	0,742
D. S. R.		0,838
Δ		53

TABLEAU XIII. — Action de l'émulsine sur sur xylose en solution dans l'alcool propylique à 90 p. 100. Expérience effectuée à la température de 30° en ajoutant en une seule fois 10 g. d'émulsine pour 100 cm³ de solution.

Temps	α	S. R'
départ	+ 58'	1,580
15 jours	— 2'	
1 mois	— 12'	0,359
6 semaines	— 12'	
Le flacon est portée à la tempér. de 50°		
4 jours	3'	0,216
D. S. R.		1,314
Δ		84,4

CINQUIEME PARTIE

Recherche de la Xylosidase β dans divers produits fermentaires

Nous avons montré la présence de la xylosidase β dans l'émulsine des amandes. Mais cette xylosidase β est peu active. Pour effectuer l'hydrolyse, et, lorsqu'elle est possible, la synthèse des alcool-xylosides β , il nous a fallu disposer d'une quantité considérable d'émulsine et prolonger longtemps les expériences. Encore est-il très difficile d'atteindre un état d'équilibre; les rendements demeurent très faibles. Aussi dans l'espoir de trouver une source de ce ferment préférable à l'émulsine des amandes, nous avons recherché la xylosidase β dans divers produits fermentaires paraissant susceptibles d'en contenir.

D'après Haworth (19) le xylane serait constitué de résidus de β xylose. Il est possible qu'une diastase capable d'hydrolyser le xylane en xylose puisse également agir sur les alcool-xylosides β . Nous étudierons l'action de la poudre fermentaire de *Coriolus versicolor*, du suc intestinal d'escargot, et de divers autres produits.

I. — CORIOLUS VERSICOLOR

M. Lutz a signalé (27) que le *Coriolus versicolor* attaque la matière ligneuse du bois de hêtre et fournit des xylanes et

du xylose. D'autre part, MM. Bourquelot et Hérissé ont montré (4 et 7) la présence d'un ferment analogue à l'émulsine dans divers champignons, et en particulier dans ceux qui vivent sur les bois.

Nous recueillons donc, en octobre, dans les bois de Meudon le *Coriolus versicolor*, abondant sur les coupes de hêtre. Les champignons, divisés aux ciseaux sont séchés à l'air libre, puis dans le vide sulfurique. Ils sont ensuite hachés finement, broyés au moulin puis séchés à nouveau. Ils sont épuisés par l'alcool à 70 c. qui entraîne des substances rouges et résineuses. La farine obtenue est essorée et séchée, c'est une poudre fermentaire très légère. C'est elle que nous employons car sa macération aqueuse ne donne qu'un léger trouble par addition d'alcool.

50 cm³ d'eau distillée contenant 7 p. 100 de méthylxyloside β et présentant une rotation de $-2^{\circ}20'$ sont additionnés de 2 g. de poudre. Après quatre semaines de séjour à l'étuve à la température de 30° en même temps qu'un témoin sans xyloside, nous n'observons aucune hydrolyse. Cependant, dans un essai effectué simultanément dans les mêmes conditions sur une solution à 3,63 p. 100 de méthylglucoside β présentant une rotation de $-1^{\circ}10'$, nous observons un retour de la déviation vers la droite ($\alpha = +1^{\circ}28'$) et une apparition de 1,74 p. 100 de sucre réducteur correspondant à l'hydrolyse de 44 p. 100 du méthylglucoside β mis en œuvre.

D'autre part, faisant agir de différentes façons cette poudre fermentaire sur le xylose en solution dans l'alcool éthylique à 95 c. nous observons une disparition de sucre réducteur atteignant jusqu'à 40 p. 100 du xylose mis en œuvre, et une diminution de la déviation droite. L'indice

de réduction enzymolytique correspondant est voisin de 1100, très différent de celui de la synthèse de l'éthylxyloside β .

En résumé, nous n'avons pas trouvé de xylosidase β dans la poudre de *Coriolus versicolor* bien qu'elle contienne manifestement un peu de glucosidase β .

II. — SUC INTESTINAL D'ESCARGOT

Le suc intestinal de l'escargot, *Helix pomatia*, si riche en ferments hydrolysants (17 bis) a permis à M. Ehrens-tein (14) d'effectuer une hydrolyse biochimique du xylane en xylose qu'il a pu pousser jusqu'à 50 p. 100 du xylane mis en œuvre.

A 50 cm³ d'une solution aqueuse de méthylxyloside β à 1,76 p. 100 présentant une déviation de $-2^{\circ}20'$, nous ajoutons 5 cm³ de suc intestinal d'escargot récemment recueilli et un peu de toluène. Un flacon témoin, sans xyloside, est préparé simultanément. Après quatre semaines de séjour à l'étuve à la température de 30°, l'expérience est arrêtée, les liquides sont déféqués au plomb, la rotation polarimétrique est observée et le sucre réducteur est dosé. Toutes corrections faites pour ramener au volume primitif, la rotation est de $-1^{\circ}28'$ et il est apparu 0,444 p. 100 de sucre réducteur, soit un indice de réduction enzymolytique de 512 très voisin de l'indice théorique, 23 p. 100 du méthylxyloside β mis en œuvre ont été hydrolysés.

Nous essayons ensuite l'action du suc intestinal d'escargot sur le xylose en solution dans l'alcool éthylique. Celui-ci précipite abondamment le suc. Nous observons un très faible retour de la déviation, et une disparition de sucre réducteur correspondant à un indice de réduction enzymolytique très différent de l'indice théorique.

Nous pouvons néanmoins conclure à la présence d'une faible quantité de xylosidase β dans le suc intestinal d'escargot, car le processus synthétisant, comme nous l'avons vu pour l'émulsine, est plus difficile à mettre en évidence que le processus hydrolysant, surtout lorsqu'on dispose d'un ferment peu actif.

III. — PRODUITS FERMENTAIRES DIVERS

Nous essayons de la même façon l'action de divers produits fermentaires.

Sur le conseil de M. le Professeur Hérissé, nous essayons l'action de la poudre fermentaire de Benoîte, *Geum urbanum* (21). Mais nous ne pouvons mettre en évidence aucune action hydrolysante sur le méthylxyloside β en solution aqueuse, ni synthétisante sur le xylose en solution dans l'alcool éthylique à 95 c.

La Rhamnodiastase, produit fermentaire des graines de *Rhamnus utilis* (11) ne nous donne pas de résultats plus satisfaisants, ce qui était d'ailleurs à prévoir puisqu'elle n'hydrolyse pas le primevérose.

Enfin, nous étudions l'action sur le xylose en solution dans l'alcool éthylique à 95 c. des tourteaux d'amandes amères épuisés à l'alcool qui sembleraient à priori devoir posséder l'activité de l'émulsine qu'ils contiennent. Avec 20 g. de tourteaux pour 100 cm³ de solution, nous observons en quinze jours à 30° et en quelques jours à 50° une disparition presque totale du sucre réducteur tandis que la déviation polarimétrique tend à s'annuler. L'indice de réduction enzymolytique observé est de 1400. Aucune synthèse n'a eu lieu, mais il s'est produit un phénomène analogue à celui observé dans

l'action de l'émulsine sur le xylose en solution dans l'alcool méthylique (voir page 59).

En résumé, en dehors de l'émulsine des amandes, c'est seulement dans le suc intestinal d'escargot que nous avons pu mettre en évidence la présence d'une xylosidase β . Ce produit ne présente pratiquement aucun avantage sur l'émulsine qui demeure jusqu'à présent et malgré sa faible teneur en xylosidase β , la meilleure source de ce ferment.

Conclusions

Nous avons établi la présence dans l'émulsine des amandes d'un ferment qui n'y avait pas encore été signalé. Nous appelons ce ferment, capable d'effectuer la synthèse et l'hydrolyse de quelques alcool-d-xylosides β , la *d-xylosidase* β . La *d-xylosidase* β voisine dans l'émulsine des amandes avec de nombreux autres ferments. Parmi ceux-ci nous citerons notamment : la *d-glucosidase* β , la *l-arabinosidase* α , la *primevérase*, qui se rapprochent de la *xylosidase* β par la nature des sucres sur lesquels ils agissent.

Nous avons effectué, à l'aide de l'émulsine des amandes, d'une part l'hydrolyse biochimique du méthyl-d-xyloside β , d'autre part la synthèse et l'hydrolyse biochimique de l'éthyl-d-xyloside β . Nous avons obtenu pour la première fois l'*éthyl-d-xyloside* β à l'état cristallisé.

Nous avons déterminé les conditions optima de l'action synthétisante de l'émulsine sur le xylose en solution dans l'alcool éthylique. Elles sont les suivantes :

Action prolongée, à la température de 40°, d'une petite quantité d'émulsine sur une solution saturée de xylose dans l'alcool à 95 c. Une forte proportion d'émulsine provoque secondairement la disparition du xylose sans formation de xyloside.

L'éthyl-d-xyloside β est très soluble dans la plupart des solvants usuels, insoluble dans l'éther. Il est faiblement solu-

ble dans le benzène bouillant, et sa solution benzénique refroidie l'abandonne à l'état cristallisé. Son point de fusion instantané déterminé au bloc Maquenne est de $+ 95^{\circ}$. Son pouvoir rotatoire spécifique est : $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = - 62^{\circ},8$. En solution aqueuse, son indice de réduction enzymolytique est de 536. Il ne réduit pas les liqueurs cupro-alkalines. Il est complètement hydrolysé par l'acide sulfurique à 3 p. 100 après trois heures de chauffage à la température de 100° . L'émulsine des amandes l'hydrolyse très lentement.

Recherchant la xylosidase β dans divers produits fermentaires, nous en trouvons seulement dans le suc intestinal de l'escargot. Cette xylosidase β est d'ailleurs moins active que celle de l'émulsine des amandes. La xylosidase β n'apparaît donc pas comme très répandue dans la nature. D'ailleurs les hétérosides β du d-xylose n'y ont pas encore été signalés à notre connaissance.

Vu, bon à imprimer :
Le Président de la Thèse,
BOUGAULT.

Vu :
Le Doyen de la Faculté,
PAUL GUÉRIN.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
CHARLÉTY.

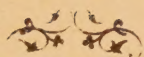
Bibliographie

1. G. BERTRAND. — Le xylose ou sucre de bois. *Thèse Dipl. Pharm.* 1^{re} classe, Paris, 1894.
2. G. BERTRAND. — Le dosage des sucres réducteurs. *Bull. Soc. Chim.*, 1906, 35, 1285.
3. EM. BOURQUELOT. — Présence d'un ferment analogue à l'émulsine dans les champignons et, en particulier, dans ceux qui sont parasites des arbres ou vivent sur le bois. *Journ. Pharm. Chim.*, 1893, 28, 385.
- EM. BOURQUELOT. — Contribution à la méthode biochimique de recherche dans les végétaux des glucosides hydrolysables par l'émulsine. *Journ. Pharm. Chim.*, 1910, 2, 241.
5. EM. BOURQUELOT et M. BRIDEL. — Sur une réaction synthétisante de l'émulsine. *Jour. Pharm. Chim.*, 1912, 5, 569.
6. EM. BOURQUELOT et M. BRIDEL. — Synthèse des glucosides d'alcool à l'aide de l'émulsine. Méthyl, éthyl, propylglucoside β . *Journ. Pharm. Chim.*, 1912, 6, 97.
7. EM. BOURQUELOT et H. HÉRISSEY. — Sur les propriétés de l'émulsine des champignons. *Journ. Pharm. Chim.*, 1895, 2, 435.

8. EM. BOURQUELOT, H. HÉRISSEY et M. BRIDEL. — Synthèse des galactosides d'alcool à l'aide de l'émulsine des amandes :
 - a) Ethylgalactoside β . C. R. Ac. Sc., 1912, 155, 731.
 - b) Propylgalactoside β , benzylgalactoside β . C. R. Ac. Sc., 1913, 156, 330.
9. M. BRIDEL. — Sur la présence dans l'émulsine des amandes de deux nouveaux ferments, la primevérosidase et la primevérase. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1926, 8, 67.
10. M. BRIDEL et CH. BÉGUIN. — Synthèse biochimique à l'aide de l'émulsine des amandes de l'éthyl-l-arabinoside α . *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1926, 8, 469.
11. M. BRIDEL et C. CHARAUX. — Le produit fermentaire extrait des graines de divers Rhamnus ou rhamno-dias-tase. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1926, 8, 35.
12. M. BRIDEL et Mlle M. DESMARETS. — Sur un procédé permettant d'extraire du tourteau d'amandes amères l'amygdalosite et l'émulsine. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1928, 10, 373.
13. J. COIRRE. — Conditions expérimentales les mieux appropriées à la préparation de l'éthylglucoside β . *Journ. Pharm. Chim.*, 1913, 8, 553.
14. M. EHRENSTEIN. — Über den enzymatischen Abbau des Xylans. *Helv. Chem. Acta*, 1926, 9, 332.
15. EM. FISCHER. — Über die verbindungen der Zucker mit den Alkoholen und Ketonen. *Ber. Chem. Ges.* 1895, 28, 1145.

16. EM. FISCHER. — Einfluss der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber. Chem. Ges.* 1895, 28, 1429.
- 16 bis. EM. FISCHER. — Bedeutung der Stereochemie für die Physiologie. *Ztschr. Für physiol. Chem.* 1898, 26, 60.
17. EM. FISCHER UND KARL ZACH. — Verwandlung der d-glucose in eine methylpentose. *Ber. Chem. Ges.*, 1912, 45, 3761.
- 17 bis. A. GIAJA. — Etude des ferments des glucosides et des hydrates de carbone chez les mollusques et les crustacés. *Thèse Doct. ès Sciences*, Paris, 1909.
18. A. GORIS et CH. VISCHNIAC. — Caractères et composition du primevérose. *Bull. Soc. Chim.*, 1920, 27, 258.
19. H. A. HAMPTON, W. N. HAWORTH, E. L. HIRST. — Polysaccharides. Part IV : The Constitution of Xylan. *Journ. of Chem. Soc.*, 1929, 8, 1739.
20. B. HELFERICH UND H. RAUCH. — Zuckersynthesen VII Die Synthese der Primevérose. *Lieb. Ann.* 1927, 455, 168.
21. H. HÉRISSEY et J. CHEYMOL. — Extraction et propriétés de géïne, glucoside générateur d'eugénol contenu dans le *Geum urbanum* L. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1925, 7, 499.
22. E. HEUSER. — Zur Kenntniss der Pentosane. *Journ. für Prakt. Chem.*, 1921, 130, 69.
23. C. S. HUDSON AND T. S. HARDING. — The Préparation of Xylose. *Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 1917, 39, 1038.

24. C. S. HUDSON AND T. S. HARDING. — The Préparation of Xylose from corn cobs. *Journ. of Amer. Chem.* 1918, 40, 1601.
 25. J. C. IRVINE AND E. L. HIRST. — The Constitution of Polysaccharides. Part VII, Esparto Cellulose. — *Journ. of Chem. Soc.*, 1924, 125, 15.
 26. A. R. LING AND D. R. NANJI. — The Préparation of Xylose from Maize Cobs. *Journ. of Chem. Soc.*, 1923, 123, 620.
 27. M. LUTZ. — Sur les ferments hydrolysants sécrétés par les champignons hyménomycètes. Dégradation des éléments constitutants de la membrane cellulaire. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1931, 13, 436.
 28. G. DE SAINT-STÉBAN. — Application du procédé biochimique de caractérisation du glucose à quelques extraits de la pharmacopée française. *Thèse Doct. Univ. (Pharmacie)*, Paris, 1922.
 29. EM. VERDON. — Contribution à l'étude de l'action synthétisante de l'émulsine. Action de l'émulsine sur glucose en solution dans l'alcool méthylique. — *Thèse Doct. Univ. (Pharmacie)*, Paris, 1913.
-



Imprimerie C. SERRE, 23, rue de Rocroy, Paris

